Aus der Abteilung für Cytopathologie
(Leiter: Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Änderungen des Polyploidiemusters in der Rattenleber während der Frühphase Aflatoxin-induzierter Canzerogenese

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf vorgelegt

von
BENNO GELSHORN

1980

Aus der Abteilung für Cytopathologie
(Leiter: Prof. Dr. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Änderungen des Polyploidiemusters in der Rattenleber während der Frühphase Aflatoxin-induzierter Canzerogenese

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf vorgelegt

von
BENNO GELSHORN

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Krüskemper

Referent

gez.: Prof. Dr.Dr. Pfitzer

Korreferent

gez.: Prof. Dr. Staib

Druck: aku-Fotodruck, Gleueler Str. 217,
5000 Köln 41, Tel. 0221/437257

Herrn Prof. Dr.Dr. P.Pfitzer möchte ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine freundliche Unterstützung und für viele wertvolle Ratschläge während meiner Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn J.Kraushaar für seine Hilfe bei der Erstellung der Statistiken sehr bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem allen Angestellten der cytologischen Abteilung für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543910_0085

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Material und Methode 2

Ergebnisse

1. Durchflußzytophotometrie 4

2. Scanningzytophotometrie

a. Imprints 11

b. Schnittpräparate 15

Diskussion 21

Zusammenfassung 28

Literaturverzeichnis 29

Einleitung

Von zahlreichen hepatotropen Canzerogenen ist bekannt, daß sie Änderungen im Polyploidiemuster der Leber auslösen (BANNASCH,1975). In der Regel handelt es sich einerseits um das Auftreten höherpolyploider Kerne und andererseits um die Entstehung von Mikrocarzinomen aus diploiden 2C-Kernen. Schon 1954 konnte GRUNDMANN mit Hilfe mikrophotometrischer DNS-Messungen das Auftreten höherpolyploider Kerne nachweisen. 1972 konnten jedoch ROMEN und Mitarbeiter zeigen, daß die initialen Kernvergrößerungen rückbildungsfähig sind und somit nicht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Hepatomen gesehen werden können, wie dies ursprünglich angenommen worden war (GRUNDMANN,1954; GLÄSS,1963).

Da sich auch nach Aflatoxinapplikation regelhafte biochemische Änderungen nachweisen lassen (NOVI,1979), sollen unsere Untersuchungen klären, ob diesen Vorgängen quantifizierbare Änderungen des Polyploidiemusters entsprechen, wie sie von NEAL und Mitarbeitern (1976) mit anderen Methoden wahrscheinlich gemacht wurden.

Material und Methode

Verwandt wurden bei den Versuchen weibliche Ratten vom Stamm Wistar II vom Zentralinstitut für Versuchstiere in Hannover. Nach Erreichen eines Gewichtes von 100g bekamen die Tiere per Magensonde 25µg Aflatoxin B1 (AFB1) gelöst in 2,5µl Dimethylformamid (DMF) 5 Tage pro Woche insgesamt 8 Wochen lang (Gesamtmenge 1mg AFB1 in 0,1ml DMF). Die Kontrolltiere bekamen nur Dimethylformamid. Die Lösungen wurden jeweils auf 1ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt (NOVI,1977).

Für die Versuche standen uns die Lebern von 22 Versuchstieren und 11 Kontrolltieren zur Verfügung. Die Tiere wurden zwischen der 9. und 72. Woche nach Beendigung der Aflatoxinapplikation zu 11 verschiedenen Terminen getötet.

Als Methoden wurden die verschiedenen Zytophotometersysteme ICP 11/PHYWE als Durchflußzytophotometer und das Scanningzytophotometer SMP/ZEISS verwandt.

Zur Durchflußzytophotometrie nahmen wir sowohl unfixierte, als auch in Alkohol fixierte Suspensionen. Zur Herstellung dieser Suspensionen zerkleinerten wir das Lebergewebe so fein wie möglich mit einer Schere und gaben 1ml Hanks Medium hinzu. Dieses Gemisch wurde durch ein Drahtsieb mit einer Maschenweite von 0,25mm filtriert und der Überstand verworfen. Ein Teil der Suspension wurde dann mit 100% igem Alkohol im Ver-

hältnis 1:10 fixiert. Alle Suspensionen wurden zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und eine Stunde mit 1% iger RNase-Lösung bei 37 Grad Celsius behandelt. Anschließend wurde das Zytoplasma durch eine 15 Minuten dauernde Behandlung mit Pepsin ebenfalls bei 37 Grad verdaut. Die Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid bei Zimmertemperatur. Vor der Messung wurde die Suspension durch ein Netz mit 70 µm Maschenweite filtriert und anschließend 10 Sekunden mit Ultraschall bestrahlt, um Verklumpungen zu lösen. Die Histogramme dieser auswahlfreien Messungen von jeweils 100.000 bis 250.000 Kernen wurden anschließend einer Computeranalyse unterworfen (PFITZER et al.,1976; VYSKA et al.,1977).

Das Scanningzytophotometer diente zur selektiven Messung morphologisch ausgewählter Kerne in Tupfpräparaten und Schnitten. Die Tupfpräparate wurden in 96% igem Alkohol 30 min fixiert, nach Feulgen gefärbt und in Eukitt eingebettet. Es wurden dann in jeweils 10 Blickfeldern bei Verwendung des Objektives 100x selektiv die 5 größten Kerne gemessen. Um einen diploiden Standard 2C festzulegen, wurden vor jeder Messung die Extinktion von 10 Lymphozytenkernen bestimmt. Schnitte wurden in den Stärken 2µ , 4µ und 6µ hergestellt und ebenfalls mit der Feulgenreaktion gefärbt. Wir haben bei Probemessungen dann festgestellt, daß eine Schnittstärke von 4µ am günstigsten ist. Das Scanningzyto-

photometer ist kombiniert mit dem Computer PDP 12. Als Programm diente Apamos II. Die Wellenlänge betrug 570nm, die Schritt- und Feldgröße 1/2μ.

Von den Messergebnissen des SMP und ICP wurden anschließend jeweils die Mittelwerte mit der Standardabweichung berechnet. Um über die Signifikanz der Ergebnisse eine Aussage machen zu können, wurden die Mittelwerte dem sog. t-Test unterzogen.

Ergebnisse

1. Durchflußzytophotometrie:

Betrachtet man die Histogramme des Impulszytophotometers (Abb. 1a-b,3a-c), so ergeben sich daraus drei verschiedene Informationen. Die erste Information bezieht sich auf den durchschnittlichen DNA-Wert jeder einzelnen Kernklasse und die zweite auf die Anzahl der Maxima innerhalb einer Population. Die dritte Information ergibt sich aus der Flächengröße unter den jeweiligen Gipfeln. Die Histogramme enthalten natürlich auch unerwünschte Teile, wie den immer wieder anfallenden ersten Gipfel zwischen den Kanälen 4 und 8, der durch Kernschutt bedingt ist. Mit Hilfe der Computeranalyse wird nun der durch den Kernschutt bedingte erste Gipfel durch Anpassung an eine Exponentialfunktion korrigiert und die Lage und Fläche unterhalb der anderen Gipfel genau berechnet.

Bei den Kontrolltieren dominieren die 2C- und 4C -Gipfel (Abb. 1a-b). Die Computeranalyse ergibt hier eine weitgehende Konstanz der Kernklassen (Abb. 2a-b, Tab. I). Der Anteil diploider 2C-Kerne beträgt durchschnittlich 64,9 ± 3,6 % und der der 4C-Kerne 31,5 ± 3,3 %. Die 8C-Kerne, die erst mit Hilfe der Computeranalyse zahlreicher Histogramme deutlich werden, liegen bei 1,6 ± 0,8 %. Betrachtet man die Histogramme in ihrem zeitlichen Ablauf, so läßt sich, neben individuellen Schwankungen, lediglich eine leichte, statistisch jedoch nicht signifikante Zunahme der 8C-Kerne in den Lebern der älteren Tiere feststellen, der Wert steigt von 1,0 ± 0,6 auf 2,9 ± 2,3 % an.

Wenn man nun die Histogramme der mit Aflatoxin behandelten Tiere betrachtet, so wird hier in erster Linie das verstärkte Auftreten einer 8C-Kernklasse deutlich (Abb. 3a-c, Tab. II). Bei den Histogrammen der Tiere, die 16 bzw. 36 Wochen nach Beendigung der Aflatoxinapplikation getötet wurden, läßt sich nur ein geringer Anteil der 8C-Kernklasse erkennen, dieser tritt jedoch bei den später getöteten Tieren deutlich in Erscheinung.

Durch die Computeranalyse der Histogramme läßt sich aber auch für die früher getöteten Tiere die 8C-Kernklasse quantifizieren (Abb. 4a-f). Bemerkenswert ist, daß sich die Werte für die aflatoxinbehandelten Tiere nicht im Hinblick auf die Klassen der diploiden 2C-Kerne unterscheiden, deren Anteil wiederum bei 64,6 ± 1,3 % liegt.

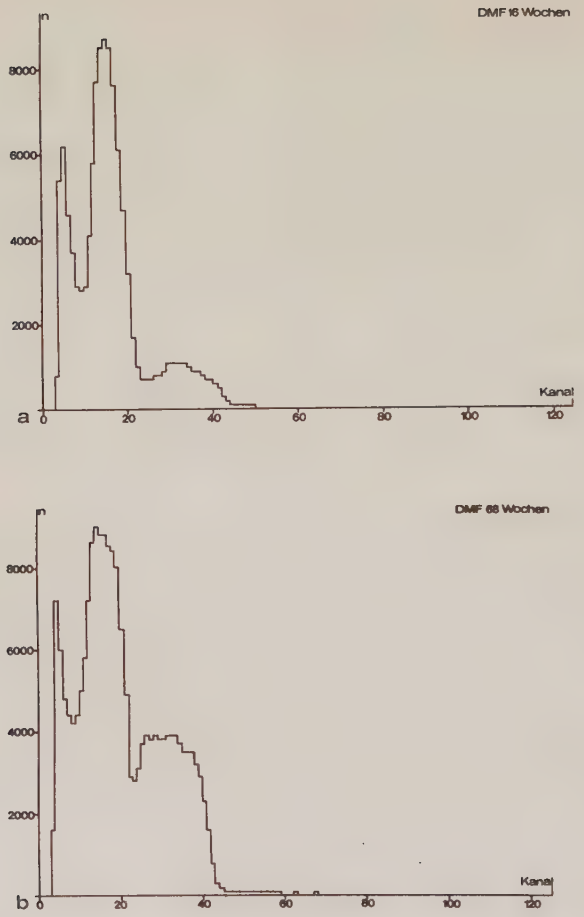


Abb. 1a-b: Histogramme der Kontrolltiere 16 (a) bzw. 68 Wochen (b) nach Beendigung der Gabe von DMF.

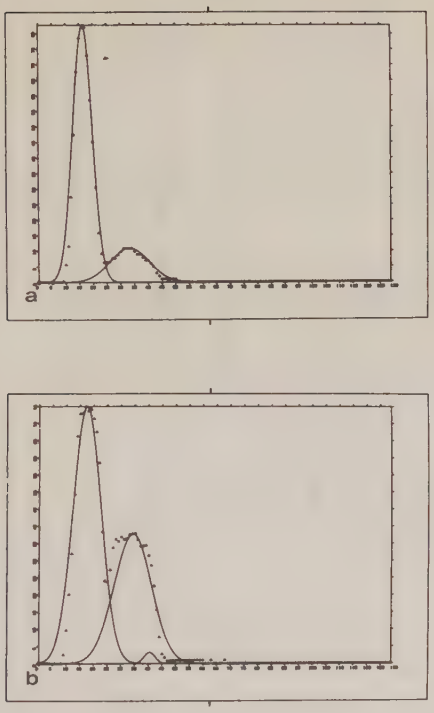
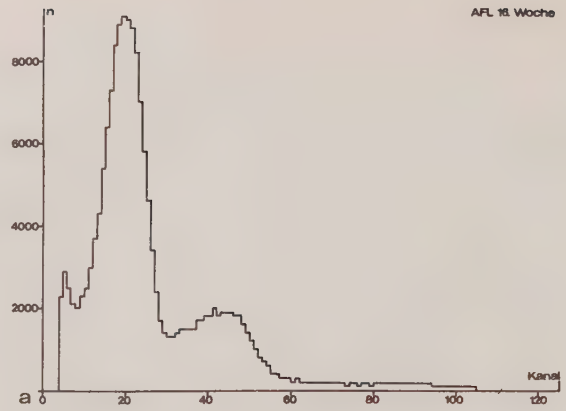
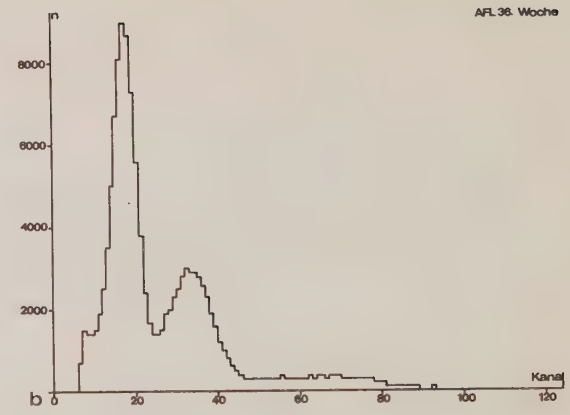


Abb. 2a-b: Computerhistogramme der Kontrolltiere 16 (a) und 68 Wochen (b) nach Beendigung der Gabe von DMF.





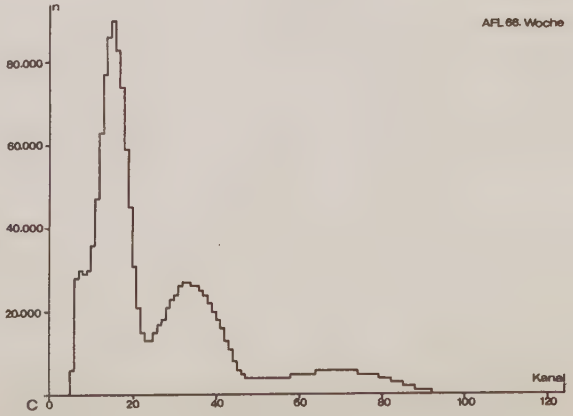


Abb. 3a-c: Histogramme der Versuchstiere 16 (a), 36 (b) und 66 Wochen (c) nach Beendigung der Gabe von AFB1.

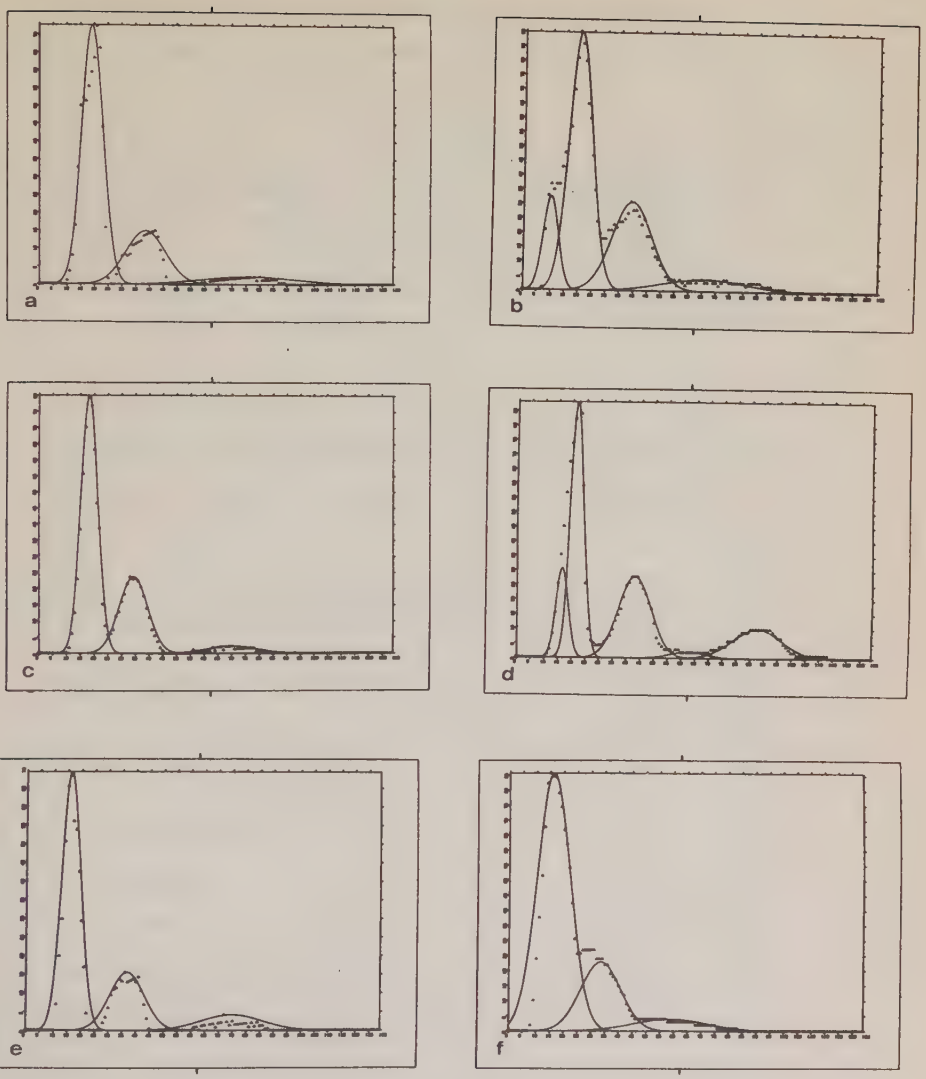


Abb. 4a-f: Computerhistogramme der Versuchstiere 12 (a), 28 (b), 36 (c), 54 (d), 66 (e) und 68 Wochen (f) nach Beendigung der Gabe von AFB1.

Tab. I: %-Anteil der Kernklassen bei den ICP-Messungen der Kontrolltiere.

Wochen	2C	3C	4C	6C	8C
16-36	65,9±5,1	1,3±0,7	30,7±4,3	1,0±0,7	1,0±0,6
36-72	62,2±3,8	0,6±0,6	33,2±5,4	1,1±1,1	2,9±2,3
Gesamtschnitt	64,9±3,6	1,1±0,5	31,5±3,3	1,0±0,6	1,6±0,8

Tab. II: %-Anteil der Kernklassen bei den ICP-Messungen der Versuchstiere.

Wochen	2C	3C	4C	6C	8C
12	65,9	-	26,1	-	4,4
16	75,6	-	21,0	-	3,4
28	58,1	3,0	31,7	-	7,1
36	66,0	-	28,5	1,2	4,3
54	60,7	-	27,0	0,7	11,7
60	81,4	-	13,2	-	5,4
66	60,5	0,8	29,8	1,1	7,8
68	66,8	-	20,6	0,6	12,0
12-36	64,1±2,3	1,3±1,3	28,8±1,8	0,4±0,4	5,4±1,3
36-68	64,9±1,6	0,2±0,1	23,6±1,2	0,7±0,3	10,7±1,1
Gesamtschnitt	64,6±1,3	0,6±0,4	25,4±1,1	0,6±0,2	9,1±1,0

Auffallend sind ferner die Schwankungen, denen die 4C- und 8C-Kerne unterworfen sind. Dabei zeigen Analysen von Histogrammen der Tiere, die bis zu 36 Wochen nach Absetzen der Aflatoxinapplikation getötet worden waren, Gemeinsamkeiten, die eine Zusammenfassung nahelegen. Hier sind die Abweichungen von der Kontrollgruppe geringfügig und beziehen sich auf eine leichte Abnahme der 4C-Kerne und eine deutliche Steigerung der 8C-Kerne von 1,0 $\pm$ 0,6 auf 5,4 $\pm$ 1,3 %. Besonders deutlich sind jedoch die Veränderungen bei den Tieren zwischen der 36. und 68. Woche. Auch hier zeigen sich zwar keine Veränderungen der 2C-Klasse, die Abnahme der 4C-Werte auf 23,6 $\pm$ 1,2 % entspricht jedoch einem $p < 0,01$ und die Zunahme der 8C-Kerne auf 10,7 $\pm$ 1,1 % ist hochsignifikant mit $p < 0,0025$. Diese Befunde entsprechen qualitativ den Angaben von NEAL und Mitarbeitern (1976), die jedoch keine Quantifizierung vorgelegt haben.

2. Scanningzytophotometrie:

a. Imprints:

Um über die Ergebnisse der Durchflußzytophotometrie hinausgehende Aussagen machen zu können, führten wir Einzelkernmessungen durch. Bei den Kontrolltieren (Abb. 5a-e) ergab sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Durchflußzytophotometrie nur eine leichte Zunahme der 8C-Kerne in den Lebern der älteren Tiere.

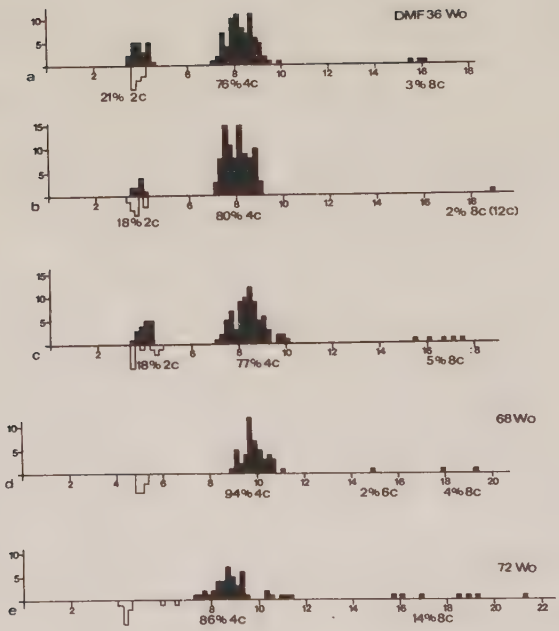


Abb. 5a-e: Selektive Messungen der größten Kerne in den Imprints der Kontrolltiere 36 (a-c), 68 (d) und 72 Wochen (e) nach Beendigung der Gabe von DMF.

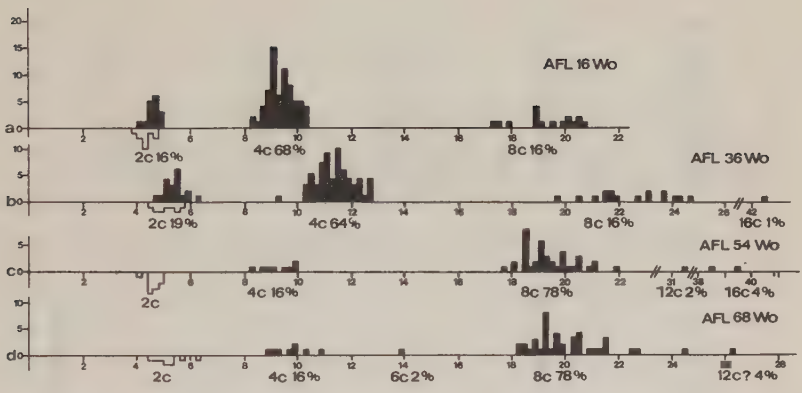


Abb. 6a-d: Selektive Messungen der größten Kerne in den Imprints der Versuchstiere 16 (a), 36 (b), 54 (c) und 68 Wochen (d) nach Beendigung der Gabe von AFB1.

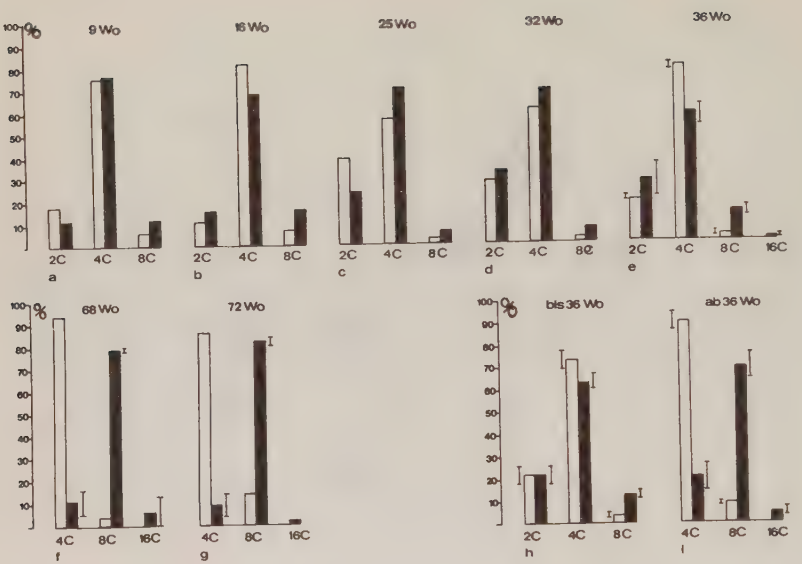


Abb. 7a-i: Vergleich der selektiven Messungen der größten Kerne in den Imprints der Kontroll- und Versuchstiere 9 (a), 16 (b), 25 (c), 32 (d), 36 (e), 68 (f) und 72 Wochen (g) nach Beendigung der Behandlung; Summe bis einschließlich der 36 Woche (h) und Summe ab der 36. Woche (i).

Der Durchschnittswert der 8C-Kernklasse im selektiven Messverfahren beträgt bei den Tieren, die bis zur 36. Woche nach Beendigung der Aflatoxinapplikation getötet wurden (Abb. 5a-c), 4,0 % und bei denen, die danach getötet wurden, 9,0 % (Abb. 5d-e). Auch bei den mit Aflatoxin behandelten Tieren stimmen die Ergebnisse gut mit den Messungen der Durchflußzytophotometrie überein. In den ersten 36 Wochen kommt es zu der bereits erwähnten geringen Erhöhung des Anteils hochpolyploider 8C- und 16C-Kerne gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 6a-b, 7a-e,h). Nach der 36. Woche werden diese Unterschiede auch bei dieser Technik besonders deutlich (Abb. 6c-d, 7f-g,i). Der 8C-Anteil steigt durch die selektive Messung der größten Kerne bis auf 70 % an, und auch die 16C-Kerne, die zum erstenmal in der 36. Woche auftraten, steigen jetzt bis auf durchschnittlich 5 % an.

b. Schnittpräparate:

Will man nun die Zunahme der hochpolyploiden Kerne topographisch lokalisieren, so müssen die Messungen an Schnittpräparaten durchgeführt werden (Abb. 8a-d). Die Bedingungen zur Messung von selektiv größten Kernen sind hier natürlich wesentlich schlechter, da bei zu geringer Schnittstärke gerade die großen Kerne häufig angeschnitten sind. Bei der Messung dieser Kerne wird ein zu geringer DNA-Gehalt registriert, während bei zu großer Schnittstärke die großen Kerne recht häufig von kleinen darüber- oder darunterliegenden Kernen

überlagert werden, wodurch dann ein zu hoher DNA-Gehalt gemessen wird. Bei einer Stärke von 4μ werden noch genügend Kerne gefunden, die weder angeschnitten sind noch durch andere Kerne überlagert werden. Diese Schwierigkeiten führen zwar zu einer stärkeren Streuung der Messergebnisse, aber es lassen sich trotzdem deutliche Unterschiede sichern.

Wir haben nun bei 6 Kontrolltieren und bei 6 mit Aflatoxin behandelten Tieren die je 30 größten Kerne in Umgebung der Periportalfelder und in Umgebung der Zentralvenen gemessen. Wenn man den Gesamtdurchschnitt für die Messung der jeweils größten Kerne in der Umgebung der Periportalfelder errechnet und vergleicht diesen Wert mit dem für die Umgebung der Zentralvenen (Abb. 9a), so ergibt sich für die Kontrolltiere kein Unterschied. Die Durchschnittswerte betragen hier 11.739 $\pm$ 344 bzw. 11.768 $\pm$ 366 Einheiten. Demgegenüber sind die Werte aller mit Aflatoxin behandelten Tiere (Abb. 9b) periportal mit 16. 008 $\pm$ 474 signifikant höher ($p < 0{,}0005$) als in der Umgebung der Zentralvene mit 12.744 $\pm$ 385 Einheiten.

Da bei den mit Aflatoxin behandelten Tieren morphologisch verschiedene Veränderungen beobachtet werden, die einmal bei drei Tieren pseudofokal und bei den anderen drei Tieren mehr oder weniger diffus auftreten, wurden die Ergebnisse entsprechend aufgeschlüsselt. Die Verteilung der Hochpolyploiden Kerne entspricht dem

mikroskopischen Befund. Betrachtet man nun bei den Tieren mit pseudofokalen Veränderungen die Werte für die größten Kerne in Umgebung der Periportalfelder (Abb. 9c), so liegen die Werte bei 16.593 ± 716 Einheiten, während sie in Umgebung der Zentralvenen bei 12.413 ± 559 Einheiten liegen ($p < 0{,}0005$). Bei den Tieren mit diffusen Veränderungen (Abb. 9d) sind zwar ebenfalls Unterschiede zwischen den Werten in Umgebung der Periportalfelder und den Zentralvenen feststellbar, diese sind jedoch wesentlich geringer und betragen 15.422 ± 619 gegenüber 13.030 ± 530 Einheiten ($p < 0{,}0025$).

Bei den Schnittpräparaten mit pseudofokalen Veränderungen, die immer in der Umgebung der Periportalfelder auftreten, haben wir einmal innerhalb eines Knötchens die 10 größten Kerne gemessen und dann in einem etwa gleich großen Gebiet neben dem Knötchen ebenfalls die 10 größten Kerne zum Vergleich herangezogen (Tab. III). Hierbei zeigt sich, daß innerhalb dieser pseudofokalen Veränderungen nur kleine Kerne mit in der Regel diploidem 2C-Gehalt liegen, Maximalwerte gehören zur 4C-Klasse. Die Durchschnittswerte betragen hier 7892 ± 757, während in der Umgebung extrem gehäuft polyploide Kerne auftreten, was einen Durchschnittswert von 20.825 ± 2489 Einheiten ergibt. Die Tatsache, daß sich die pseudofokalen Veränderungen ausschließlich in der Umgebung von Periportalfeldern befinden und gerade in Umgebung dieser

Knötchen die hochpolyploiden Kerne sehr gehäuft auftreten, erklärt die beschriebenen Befunde (Abb. 9c). Bei den Tieren mit mehr diffusen Veränderungen dagegen liegen die hochpolyploiden Kerne wesentlich weiter gestreut in der Umgebung der Periportalfelder, und es treten somit auch einzelne große Kerne in der Umgebung von Zentralvenen auf.

Tab. III: Durchschnittswerte der SMP-Messungen an den Schnittpräparaten mit histologisch pseudofokalen Veränderungen.

Tier	Knoten	Umgebung
173	9625 ± 780	30.081 ± 4199
176	7076 ± 1195	15.817 ± 1936
177	6974 ± 295	16.576 ± 1332
Gesamtschnitt	7892 ± 757	20.825 ± 2489

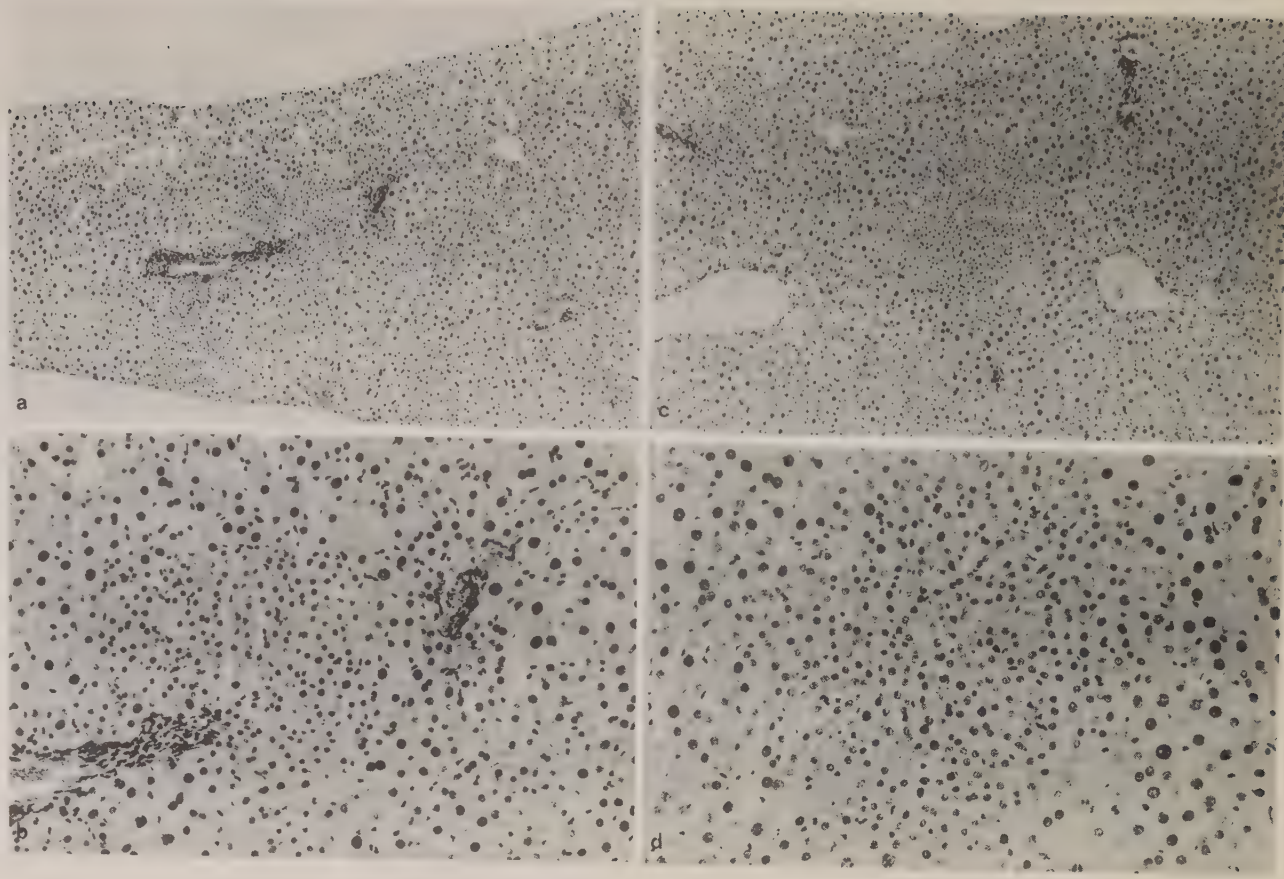


Abb. 8a-d: Histologie der pseudofokalen Veränderungen

(Tier Nr.173) HE, a,c 92x; b,d 240x.

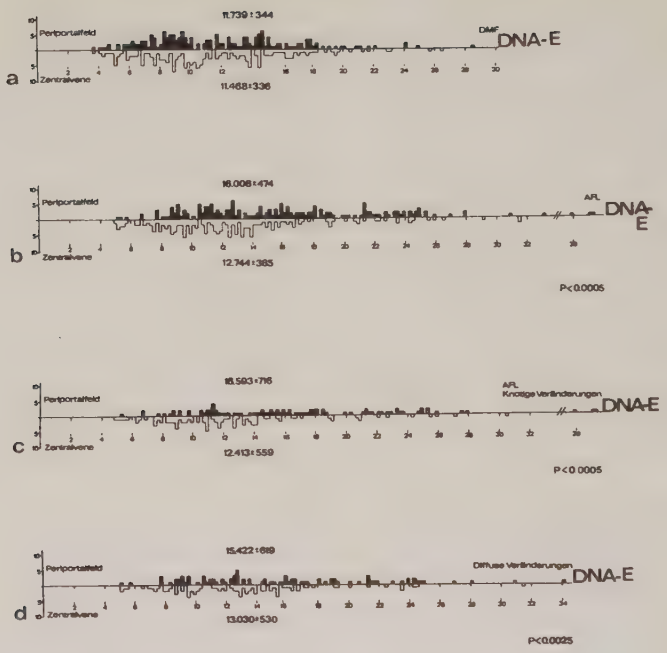


Abb. 9a-d: Selektive Messungen der größten Kerne in Schnittpräparaten a: Kontrolltiere, b: Versuchstiere, c: Versuchstiere mit pseudofokalen Veränderungen, d: Versuchstiere mit diffusen Veränderungen.

Diskussion

Die Geschichte der experimentellen Lebertumoren beginnt im Jahre 1924 als M.B. SCHMIDT bei einer Maus ein knotiges Leberadenom beschrieb, das durch die Einwirkung von Scharlachrot entstanden war. Sehr wichtig für die weitere Forschung über die experimentellen Lebertumoren waren dann die Arbeiten von YOSHIDA (1932) und KINOSITA (1937) an Ratten über die Wirkung des im Scharlachrot enthaltenen Azofarbstoffes o-Amidoazotoluol und des daraus abgeleiteten Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb) an der Rattenleber. Im Laufe der Zeit wurden sehr viele weitere hepatotrope Carzinogene gefunden, die zum Teil eine Ausbeute von 100% bei der Erzeugung von Lebertumoren zeigen, was besonders günstige Voraussetzungen für die Analyse der Tumorentstehung bietet.

Sehr früh wurde deutlich, daß die Lebercirrhose keine Voraussetzung für das Leberzellkarzinom ist, sondern daß das gemeinsame Auftreten dosisabhängig ist. Man fand nämlich heraus, daß es zwei verschiedene zelluläre Schädigungstypen gibt, den zentralen und den peripheren Typ. Während der zentrale Schädigungstyp, der zur Cirrhose führt, stark abhängig von der Dosierung ist und bei Reduzierung der Dosis nicht auftritt, zeigt der periphere Typ eine grundsätzlich andere Dosisabhängigkeit und steht in enger Beziehung zur Ausbildung der hyperplastischen Areale und Knoten, die als unmittelbare Vorstufe der Hepatome angesehen werden. Innerhalb dieser

hyperplastischen Areale lassen sich heute mindestens vier pathologische Zelltypen gegeneinander abgrenzen nämlich die klaren Glykogenspeicherzellen, die azidophilen Zellen, die Fettspeicherzellen und die basophilen Zellen. Zur Untersuchung der rein canzerogenen Wirkung der verschiedenen Stoffe ist es am günstigsten, sogenannte Stopversuche zu machen, da nach Absetzen des Giftes toxische Schädigungen sich meistens zurückbilden, während die Tumoren sich erst nach einer mehr oder weniger langen Latenzzeit entwickeln. Bei diesen Versuchen wird das Gift den Tieren über einen bestimmten Zeitraum verabreicht, und die Tiere werden dann zu verschiedenen Zeiten nach Absetzen des Giftes getötet und untersucht.

Der Stopversuch wurde ferner auch wichtig für die Untersuchungen von Kerngrößenveränderungen. So wurde z.B. an Nitrosomorpholin-behandelten Ratten (ROMEN et al., 1972) gefunden, daß die Kernflächen am Ende der akuten Vergiftungsphase sehr stark vergrößert sind, während sie ein Jahr nach Absetzen des Nitrosomorpholins entweder der Norm entsprechen oder nur sehr gering davon abweichen. Schon 4 Wochen nach Absetzen des Carzinogens war ein deutlicher Rückgang der Großkerne zu verzeichnen. Nach einer Latenz von ein bis zwei Jahren entstanden regelmäßig Hepatome, wo die stark vergrößerten Kernflächen wieder gefunden wurden.

Durch zytophotometrische Bestimmung des DNS-Gehaltes der Zellkerne wurde weiterhin deutlich, daß zahlreiche hepa-

totrope Canzerogene Änderungen im Polyploidiemuster hervorrufen. Schon 1954 konnte GRUNDMANN an Buttergelb -geschädigten Rattenlebern durch Bestimmung des DNS-Gehaltes nachweisen, daß die Kerngrößenveränderungen mit einer entsprechenden Vermehrung des DNS-Gehaltes einhergehen. Es wurde dann in vielen weiteren Versuchen festgestellt, daß es sich bei den Veränderungen in der Regel einerseits um das Auftreten höherpolyploider Kerne und andererseits um die Entstehung von Mikrokarzinomen aus diploiden 2C-Kernen handelt, die ja auch bei unseren Untersuchungen gefunden wurden. ROMEN stellte im Gegensatz zu GRUNDMANN bei seinen Stopversuchen keinerlei Hinweise auf eine Zunahme kleiner diploider Kerne vor Ausbildung der Hepatome fest.

Die carzinogene Wirkung von Aflatoxin in der Leber von Ratten wurde erstmals von LANCASTER und Mitarbeitern (1961) beschrieben. Sie stellten fest, daß bei 9 von 11 Ratten, die 6 Monate mit einer Diät gefüttert wurden, die 20% hochtoxisches Erdnußkernmehl enthielt, ein Lebertumor entstand. BUTLER (1964) untersuchte die akute Toxizität von Aflatoxin. Er fand dabei, daß Aflatoxin schon nach 48-72 Std. eine Nekrose in der Periportalzone auslöst und, was sehr wichtig für die weiteren Untersuchungen der carzinogenen Wirkung war, daß weibliche Ratten wesentlich unempfindlicher gegenüber der toxischen Wirkung des Aflatoxins sind als männliche. NEAL und Mitarbeiter (1976) untersuchten die Wirkung des Aflatoxins

auf die Leberzellkerne nach akuter und chronischer Dosierung. Die wichtigsten Ergebnisse waren eine Abnahme der tetraploiden Kerne, die Zunahme diploider und octoploider Kerne, sowie das Auftreten höherer Kernklassen. Ferner wird beschrieben, daß die Zunahme der diploiden Kerne nach Absetzen des Giftes aufhört. Entsprechend konnten wir diese Zunahme nicht feststellen, da es sich bei unserem Versuch um einen sog. Stopversuch handelte.

Für unsere Untersuchung von besonderem Interesse sind die histologischen Ergebnisse der Versuche von NOVI (1977), da wir für unsere zytophotometrischen Messungen die Lebern derselben Ratten verwandten. In dieser Serie bekamen die Ratten innerhalb von 8 Wochen eine Aflatoxinmenge von möglichst geringem toxischem Effekt, welche aber mit Sicherheit nach einem Jahr einen hepatozellulären Tumor erzeugt. Außerdem wurden weibliche Ratten genommen, die ja weniger anfällig für die akute toxische Wirkung des Aflatoxins sind. Die Ratten erhielten insgesamt 0,1ml DMF als Lösungsmittel für das Aflatoxin. Bei dieser Menge sind keine pathologischen Veränderungen zu erwarten (HEATH,1962). Das Fehlen von Gallengangsproliferationen, Fibrosen und Zirrhosen während der Untersuchungen bestätigte diese Annahme.

Die wichtigsten histologischen Ergebnisse waren nun, daß in den ersten 16 Wochen nur eine leichte Zunahme der Megalozyten festzustellen war. In der folgenden

Zeit wurde das Auftreten einiger Zusammenballungen kleiner Hepatozyten in der Nähe von Periportalfeldern beobachtet. Nach 42 Wochen konnte man bei einigen Hepatozyten in der Umgebung der Periportalfelder Mitosen beobachten. Außerdem entstanden Knoten neu gebildeter Hepatozyten, die entweder direkt an Periportalfelder grenzten oder in sehr geringer Entfernung von diesen zu finden waren. Nach 52 Wochen degenerierte dann die Mehrzahl der neu entstandenen Hepatozyten. Wesentlich ist, daß die basophilen, periportal liegenden Hepatozyten den Zelltyp darstellen, der durch Proliferation auf die Gabe von Aflatoxin reagiert und daß die neugebildeten Hepatozyten dem histologischen Standard von neoplastischen Zellen entsprechen. Ferner lassen sich parallel zu diesen morphologischen Veränderungen (NOVI, 1979) regelhafte biochemische Änderungen nachweisen. Sie lassen sich als Gewichtsvermehrung der Leber während einer Hypertrophiephase, gefolgt von einer Hyperplasiephase mit Zunahme der extrahierbaren DNS deuten.

Um festzustellen, ob diesen Vorgängen Änderungen des Polyploidiemusters entsprechen, verwandten wir zwei Methoden, nämlich die Durchflußzytophotometrie zur auswahlfreien Messung von Kernen in Suspensionen und die Scanningzytophotometrie zur selektiven Messung morphologisch ausgesuchter Kerne an Schnitten und Tupfpräparaten. Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse erkennt man, daß die Ergebnisse dieser beiden Methoden gut über-

einstimmen und sich vor allem ergänzen. Die Durchfluß-zytophotometrie z.B. zeigt, daß bei der 2C-Klasse zwischen Kontroll- und Versuchstieren kaum Unterschiede bestehen, was mit der selektiven Messung der größten Kerne nicht erfaßt werden kann. Die sehr deutliche Erhöhung der 8C -Klasse nach der 36. Woche kommt aber bei dieser Methode besonders gut heraus. Die Scanningzytophotometrie wiederum hat den Vorteil, daß auch sehr hochpolyploide Kernklassen erfaßt werden können und daß man mit Hilfe der Schnittpräparate deutlich machen kann, wo die Veränderungen am ausgeprägtesten sind.

Anhand unserer Ergebnisse können wir feststellen, daß während der ersten 36 Wochen nur geringfügige Veränderungen im Polyploidiemuster auftreten und dies entspricht der Deutung dieses Abschnittes als einer durch Hypertrophie gekennzeichneten Phase. Während einer zweiten Phase kommt es zu einer signifikanten Abnahme der 4C- und einer Zunahme der 8C-Klasse, was mit den Befunden von NEAL und Mitarbeitern übereinstimmt. Ob jedoch die Abnahme der 4C-Klasse als gezielte Schädigung dieser Zellen durch Aflatoxin gedeutet werden kann, erscheint fraglich. Die 4C-Klasse kann nämlich nicht als einheitlich angesehen werden, da sie sowohl die tetraploiden G1-Kerne als auch die prämitotischen, diploiden G2-Kerne umfaßt. Individuelle Unterschiede in der Häufigkeit der 4C- und 8C-Kerne könnten demzufolge auch dem Ablauf von Teilungswellen im Rahmen einer Hyperplasie entsprechen. Die

gegenüber den Kontrollen gesteigerte Häufigkeit der 8C-Kerne wäre dann als Folge gestörter Mitosen zu deuten. Die von NEAL und Mitarbeitern (1978) beschriebene aflatoxinprotektive Wirkung der Hypophysektomie bestünde bei dieser Deutung nicht in einem direkten Schutz der 4C-Kerne, sondern in einer verminderten Teilungshäufigkeit diploider G2-Kerne, die dann nicht aus der 4C-Gruppe abwandern, sondern in ihr verbleiben. Unsere Versuche zeigen außerdem, daß auch bei einem Stopversuch nach langer Dauer noch Änderungen im Polyploidiemuster auftreten und zwar außerhalb der pseudofokalen Proliferate, die wohl für die regelhafte Bildung von Tumoren als Ursprung gelten müssen. Diese Tatsache deutet daraufhin, daß das Aflatoxin auch nach langer Latenzzeit noch Auswirkungen auf das Lebergewebe haben kann.

Zusammenfassung

Die Änderungen der Polyploidie in der Leber von Ratten wurde mit der auswahlfreien Durchflußzytophotometrie an einer großen Zahl von Kernen in Suspensionen und mit dem Scanningzytophotometer an morphologisch selektierten Kernen in Tupfpräparaten und Schnitten untersucht.

Die 22 Tiere wurden zwischen 9 und 72 Wochen nach Beendigung der Aflatoxingabe getötet.

Während einer ersten etwa 36 Wochen umfassenden Phase der H y p e r t r o p h i e treten neben individuellen Schwankungen nur geringe Verschiebungen ein. Nach der 36. Woche werden während der Phase der H y p e r p l a s i e Verschiebungen in Form einer Abnahme der 4C-Kerne und eine Zunahme der 8C-Kerne deutlich. Während die Abnahme der 4C-Kerne auf Teilungen diploider G2-Kerne zurückgehen dürfte, sind die vermehrt auftretenden 8C-Kerne die Folge gestörter Mitosen.

Die Verteilung der hochpolyploiden Kerne entspricht dem mikroskopischen Befund pseudofokaler oder mehr diffuser Veränderungen. Das Auftreten von Änderungen im Polyploidiemuster nach langer Dauer außerhalb der pseudofokalen Proliferate, spricht für eine lang anhaltende Wirkung des Aflatoxins.

Literaturverzeichnis

BANNASCH,P.: Die Cytologie der Hepatocarzinogenese. Hdb. Allg.Pathol. VI/7, 123-276 (1975)

BUTLER,W.H.: Acute toxicity of Aflatoxin B1 in rats. Br.J.Cancer 18, 756-762 (1964)

GLÄSS,E.: Die Genomsonderung während der durch Buttergelb induzierten Cancerogenese der Rattenleber. Z.Krebsforsch. 65, 409-424 (1963)

GRUNDMANN,E.: Beiträge zur Krebsentstehung in der Rattenleber, an Hand mikrophotometrischer DNS-Messungen. Verh.dtsch.Ges.Path 38, 362-370 (1954)

HEATH,D.F.: The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamine in rats. Biochem.J. 85, 72 (1962)

HOBIK,H.P. und GRUNDMANN,E.: Quantitative Veränderungen der DNS und RNS in der Rattenleber während der Carzinogenese durch Diäthylnitrosamin. Beitr.path.Anat. 127, 25-48 (1962)

KINOSITA,R.: Studies on the cancerogenic chemical substances. Trans.Soc.Path.Jap. 27, 665-725 (1937)

LANCASTER,M.C., JENKINS,F.P. und PHILP,J.McL.: Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. Nature Lond. 192, 1095-1096 (1961)

NEAL,G.E., GODOY,H.M., JUDAH,D.J. und BUTLER,W.H.: Some effec ts of acute and chronic dosing with Aflatoxin B1 on rat liver nuclei. Cancer Res. 36, 1771-1778 (1976)

NEAL,G.E. und JUDAH,D.J.: Effect of hypophysectomie and Aflatoxin B1 on rat liver. Cancer Res. 38, 3460-3467 (1978)

NOVI,A.M.: Liver carcinogenesis in rats after Aflatoxin B1 administration. Current topics in path. 65, 115-163 (1977)

NOVI,A.M.: Molekulare und zelluläre Vorgänge während der Frühphase der Aflatoxin B1-induzierten Lebercarzinogenese. Verh.dtsch.Ges.Path. 63, 476-477 (1979)

PFITZER,P., VYSKA,K. und STECHER,G.: Zur Analyse von DNA-Histogrammen durch Computer. Beitr.Path.Pd. 159, 157-185 (1976)

ROMEN,W. und BANNASCH,P.: Karyokinese und Kernstruktur. I. Mitosen und Mitosestörungen in Hepatozyten und Hepatomzellen der Nitrosomorpholin-vergifteten Rattenleber. Virchows Arch.Abt.B 11, 24-33 (1972)

ROMEN,W., ROSS,W. und BANNASCH,P.: Cytomorphologische und morphometrische Studien der Hepatocarzinogenese. II. Die Reversibilität von Kerngrößenveränderungen in der Nitrosomorpholin-vergifteten Rattenleber. Z.Krebsforsch. 77, 134-140 (1972)

SCHMIDT,M.B.: Über vitale Fettfärbung in Geweben und Sekreten durch Sudan und geschwulstartige Wucherungen der ausscheidenden Drüsen.
Virchows Arch.path.Anat. 253, 432-451 (1924)

VYSKA,K., PFITZER,P. und KRAUSHAAR,J.: Computeranalyse von DNA-Histogrammen.
Verh.dtsch.Ges.Path. 61, 479 (1977)

YOSHIDA,T.: Über die experimentelle Erzeugung von Hepatomen durch die Fütterung mit o-Aminoazotoluol.
Proc.Imp.Acad.(Tokyo) 8, 464 (1932)

Lebenslauf

Zur Person: Benno Gelshorn
geb. 20.03.1951 in Düsseldorf
katholisch, deutscher Staatsbürger

Eltern: Vater: Friedrich Gelshorn
geb. 11.03.1926
Beruf: Versicherungskaufmann

Mutter: Karin Gelshorn, geb. Grothaus
geb. 9.11.1929

Schulausbildung: 1957-61 Marienschule Osnabrück
1961-70 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium
Neusprachliches und mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Osnabrück

Studium:

SS 1971- WS 1972/73	Studium der Chemie an der Universität Münster
WS 1973/74- SS 1975	Studium der Geologie an der Universität Münster
WS 1975/76- SS 1976	Studium der Medizin an der Universität Bochum
SS 1976	Ärztliche Vorprüfung
WS 1976/77	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf
SS 1977	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
SS 1979	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Zur Zeit befinde ich mich im 12. Fachsemester an der Universität Düsseldorf.